

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 août 2005 (04.08.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/071097 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/02,
B01J 19/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/050025

(22) Date de dépôt international :
17 janvier 2005 (17.01.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0400433 19 janvier 2004 (19.01.2004) FR

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) : COM-
MISSARIAT A L'ÉNERGIE ATOMIQUE [FR/FR];
31-33 rue de la Fédération, F-75752 PARIS 15ème (FR).
ECOLE POLYTECHNIQUE FEDERALE DE LAU-
SASSE (EPFL) [CH/CH]; CH-1015 LAUSASSE (CH).

(72) Inventeurs; et

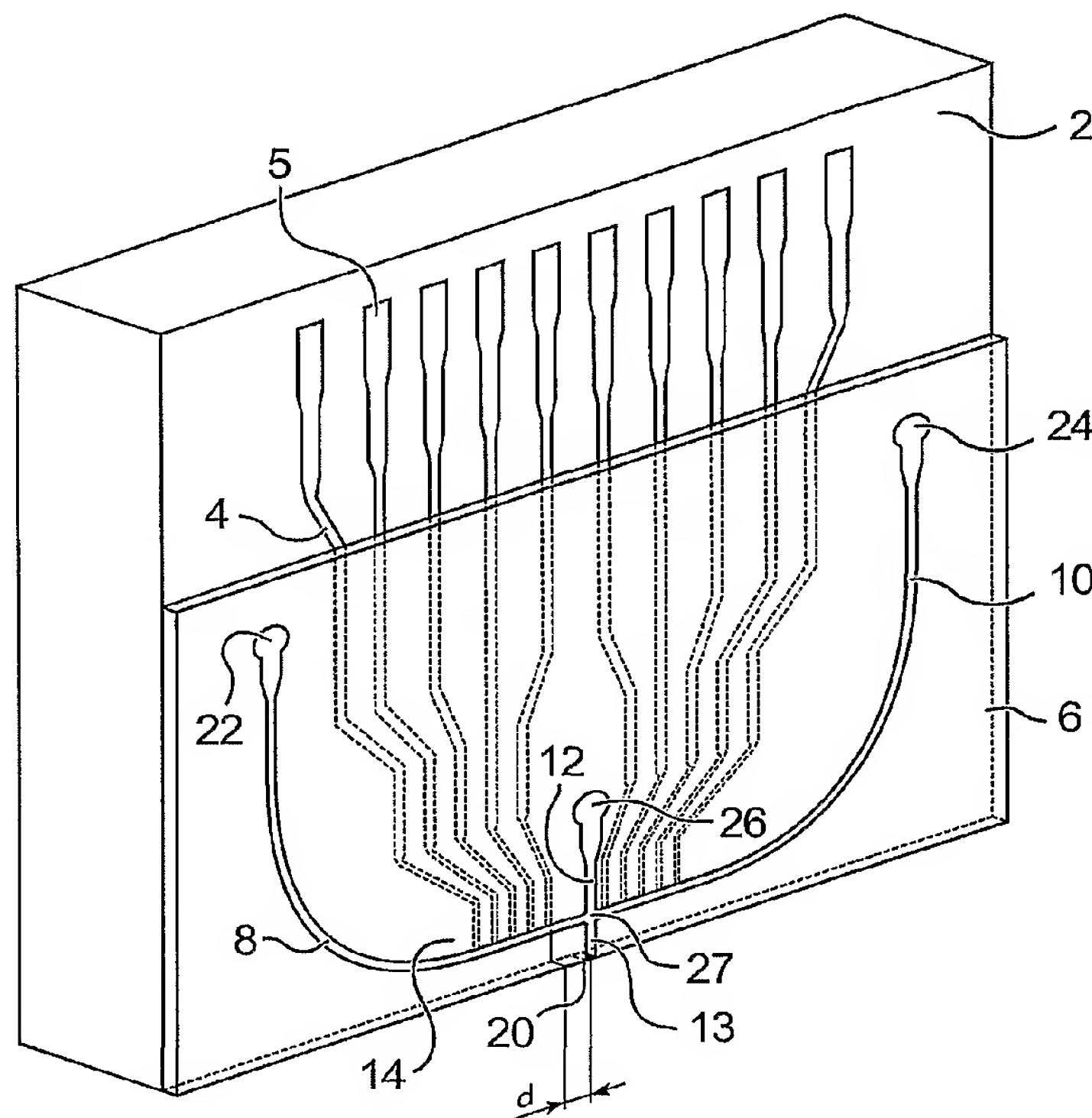
(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **RENAUD,**
Philippe [CH/CH]; Chemin neuf, N°11, CH-1028 PRE-
VERENGES (CH). **PICOLLET-D'HAHAN, Nathalie**
[FR/FR]; Le Crozat, F-38580 LA FERRIERE (FR).
HAGUET, Vincent [FR/FR]; 2, chemin des Marronniers,
F-38100 Grenoble (FR). **CHATELAIN, François**
[FR/FR]; 761, chemin du Bressot, F-38470 Beaulieu (FR).

(74) Mandataire : **LEHU, Jean**; BREVATOME, 3, rue du
Docteur Lancereaux, F-75008 PARIS (FR).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: DEVICE FOR DISPENSING MICROFLUIDIC DROPLETS, PARTICULARLY FOR CYTOMETRY

(54) Titre : DISPOSITIF DE DISPENSE DE GOUTTELETTES MICROFLUIDIQUES NOTAMMENT POUR LA CYTOMETRIE



(57) Abstract: The invention relates to a device for dispensing droplets comprising a first channel (8, 10), known as the main channel, for circulating a first liquid flow, a second channel (12, 13) for circulating fluid, forming an intersection area (27) with the first channel and being terminated by an ejection opening (20), means (4) for measuring a physical property of particles or cells in the first channel (18), and means for producing a pressure wave in the second channel (12, 13).

(57) Abrégé : L'invention concerne un dispositif de dispense de gouttelettes comprenant un premier canal (8, 10), dit canal principal, pour une circulation d'un premier flux de fluide, un deuxième canal (12, 13) de circulation de fluide, qui forme avec le premier canal une zone d'intersection (27) et qui se termine par un orifice d'éjection (20), des moyens (4) de mesure d'une propriété physique de particules ou de cellules dans le premier canal (18), et des moyens pour engendrer une onde de pression dans le deuxième canal (12, 13).

WO 2005/071097 A1



(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

**DISPOSITIF DE DISPENSE DE GOUTTELETTES MICROFLUIDIQUES
NOTAMMENT POUR LA CYTOMETRIE**

DESCRIPTION

5 DOMAINE TECHNIQUE

L'invention concerne un procédé et un dispositif de manipulation de particules en suspension en vue d'extraire les particules d'intérêt.

10 Plus spécifiquement, l'invention se rapporte à un dispositif pour l'analyse et le tri de cellules vivantes non marquées, et la dispense sans contact, et à la demande, de gouttelettes de liquide contenant les cellules sélectionnées.

15 Ce dispositif rend possible le dépôt des cellules sur un substrat, avec en particulier une grande précision dans le positionnement des cellules. L'invention peut par exemple être utilisée pour la production de puces à cellules comprenant un ou différents types cellulaires sur un même substrat.

20 A ce titre, le dispositif selon l'invention est un instrument très flexible permettant de réaliser de manière automatisée la détection, le dénombrement, l'analyse, le tri et la dispense de particules ou de cellules.

25 ART ANTÉRIEUR

30 La cytométrie en flux est une technique utilisée en biologie moléculaire et en biologie cellulaire, et désigne l'analyse des caractéristiques moléculaires de cellules circulant en flux continu devant un détecteur. L'analyse cytométrique permet

l'identification, le dénombrement et la caractérisation des cellules ou d'autres particules biologiques (bactéries, parasites, spermatozoïdes, noyaux, chromosomes) en fonction de paramètres physico-chimiques prédéfinis par l'opérateur. L'intérêt de la cytométrie en flux repose sur la simplicité de manipulation des cellules : le capillaire à travers lequel passent les cellules est directement connecté au réservoir contenant la suspension cellulaire à caractériser.

De plus, puisque les cellules sont injectées une à une et de manière continue devant le détecteur, les vitesses d'identification des cellules sont souvent importantes et peuvent atteindre plus d'un millier de cellules par seconde pour certains instruments.

En revanche, la caractéristique moléculaire étudiée doit généralement être mise en évidence par une méthode de marquage, et ainsi, ce n'est pas réellement le paramètre spécifié qui est détecté par l'appareil, mais le marqueur qui lui est associé.

La technique la plus courante de marquage est un marqueur fluorescent greffé à un composant moléculaire spécifique des cellules étudiées ; le marqueur fluorescent est excité en flux par un faisceau laser et sa réponse est détectée par un appareillage optique et caractérisée par une électronique associée.

Toutefois, le marquage préalable des cellules nécessite une étape de préparation des cellules avant de pouvoir réaliser leur analyse. Le marquage en fluorescence présente un intérêt

essentiellement pour des cellules aux caractéristiques très proches et dont les différences ne sont quasiment pas décelables par une autre approche, par exemple des cellules d'un même type cellulaire dont une souche est
5 saine et une autre est cancéreuse.

Il existe cependant un grand nombre de cas où la séparation d'une suspension cellulaire hétérogène peut être effectuée sur de simples critères de taille, de propriétés membranaires et/ou cytoplasmiques, cas
10 pour lesquels un marquage n'est pas nécessaire.

Un tri non-destructif des cellules fait souvent suite à la caractérisation en flux des cellules sur la base de critères de positivité ou de négativité définis à l'avance par l'opérateur. L'échantillonnage
15 réalisé permet d'extraire les particules d'intérêt de la solution et de les collecter en une ou plusieurs fractions purifiées dans des récipients spécifiques. La technique du tri des cellules est devenu un outil dans une large gamme de domaines tels que l'immunologie,
20 l'oncologie, l'hématologie, la génétique...

Un besoin existe donc pour un système économique capable d'analyser en flux et de trier en conséquence une large gamme de particules, par exemple de cellules non marquées en provenance de solutions de
25 viscosités et de concentrations protéiques variées.

Par ailleurs, il existe un besoin d'outils permettant la manipulation de particules ou de cellules uniques, en particulier pouvant séparer individuellement chaque cellule à partir d'une
30 suspension cellulaire et positionner chacune des cellules d'intérêt dans un site spécifique.

Un besoin existe aussi pour un outil de dispense rapide, économique, flexible et facile à opérer permettant le positionnement individuel de cellules vivantes dans des sites localisés sur un
5 réseau à deux dimensions.

Toutes les méthodes connues de tri cellulaire collectent l'ensemble des cellules répondant aux critères spécifiés dans un récipient intermédiaire ou mettent en œuvre des étapes de concentration
10 cellulaire par centrifugation, avant d'utiliser une autre technique de séparation pour disposer de cellules individuelles.

Il existe donc un besoin pour supprimer l'étape intermédiaire de collecte de sous-populations purifiées, et pour séparer directement les cellules sur
15 le substrat.

Toutefois, il n'existe pas à l'heure actuelle de système intégrant dans un même dispositif les fonctions d'analyse et de tri en flux de cellules
20 ou de particules, et la dispense des cellules ou particules d'intérêt sur un substrat.

Le document EP 1335198 décrit un dispositif comportant un canal pour l'alimentation en flux, une zone de mesure par impédancemétrie au moyen d'une série
25 d'électrodes, une zone de tri des particules, des bandes conductrices pour transporter des signaux de et vers les électrodes. Le moyen utilisé pour trier les particules est la diélectrophorèse, à l'aide d'un système d'électrodes.

30 Ce dispositif connu dispose d'un canal à trois branches : une branche d'entrée du fluide, et

deux branches de sortie, les particules étant dirigées vers l'une ou l'autre sortie. L'orientation des particules vers telle ou telle sortie se fait nécessairement au moyen des électrodes agissant par diélectrophorèse sur les particules en suspension.

Ce dispositif se borne à séparer un fluide entrant en deux fluides continus, dont l'un contient des particules triées. Il ne permet pas d'extraire des microgouttelettes d'un fluide.

Il se pose donc le problème de trouver un dispositif permettant une extraction ou une éjection de gouttelettes.

Un système d'éjection dirigée à partir d'un fluide porteur est proposé dans la demande de brevet WO 02/44319, déposée par la société Picoliter. Cependant le moyen pour diriger les cellules se base sur un système d'ondes focalisées, typiquement des ondes acoustiques tel que décrit dans la demande de brevet WO 02/054044 déposée par la même société. La précision envisageable à l'aide d'un dispositif de focalisation par ondes acoustiques est cependant faible, du fait de la difficulté de focaliser une onde ultrasonore de manière précise, fiable et reproductible.

Il se pose donc également le problème de trouver un dispositif qui mette en œuvre une autre technique d'éjection.

EXPOSÉ DE L'INVENTION

L'invention vise à résoudre ces problèmes.

L'invention concerne d'abord un dispositif de dispense de gouttelettes comprenant :

- un premier canal, dit canal principal, pour une circulation d'un premier flux de fluide,
- un deuxième canal de circulation de fluide, qui forme avec le premier canal une zone d'intersection
5 et qui se termine par un orifice d'éjection,
- des moyens de mesure d'une propriété physique de particules ou de cellules dans le premier canal et,
- des moyens pour engendrer une onde de
10 pression dans le deuxième canal.

L'invention concerne donc un dispositif de dispense sans contact de particules ou de cellules, par exemple sur un substrat, les particules étant sélectionnées au moyen du déclenchement d'un moyen pour
15 engendrer une onde de pression.

L'invention permet donc la sélection de particules ou de cellules non marquées en suspension, puis la dispense sans contact et à la demande des particules ou des cellules, par exemple sur un
20 substrat.

L'invention diffère des composants selon l'art antérieur, notamment par les moyens pour engendrer une onde de pression dans un canal supplémentaire, l'orientation et l'éjection des
25 particules se faisant sous l'impulsion de cette onde de pression.

En outre, un dispositif selon l'invention comporte au moins deux branches de canal d'entrée : une entrée du canal principal, pour un premier fluide, et
30 une branche d'entrée du deuxième canal.

Le dispositif selon l'invention inclut, dans un espace réduit, un système de détection et d'analyse des particules, par exemple par impédancemétrie, et un microdispenseur pour l'éjection
5 à la demande de gouttelettes contenant les microparticules d'intérêt.

Le dispositif peut notamment avoir des applications à de la dilution, ou au mélange, ou à la concentration, ou à d'autres applications au tri des
10 particules.

Selon l'invention, l'éjection des particules n'est pas liée à un phénomène électrique appliqué directement aux particules, mais s'effectue par éjection d'une micro-gouttelette sous l'effet d'une
15 onde de pression (peu importe la charge des particules), avec éventuellement adjonction d'un second fluide.

Le dispositif peut en outre comporter des moyens d'analyse des signaux électriques et de
20 déclenchement de l'ouverture des moyens pour engendrer une onde de pression.

Au cas où une particule ou une cellule vérifie des critères spécifiés, le déclenchement des moyens pour engendrer une onde de pression peut être
25 piloté par un signal ou des signaux provenant de ces moyens d'analyse ou de commande recevant des signaux des moyens de détection ou de mesure.

Un dispositif microfluidique selon l'invention permet l'analyse et la sélection de
30 particules en suspension dans un fluide en flux.

L'invention permet notamment d'extraire d'un fluide des micro-gouttelettes.

L'invention concerne donc également un dispositif permettant la détection, et/ou le
5 dénombrement et/ou la caractérisation en flux de particules ou de cellules, par exemple des cellules vivantes non-marquées, suivis du tri et de la dispense des particules ou cellules d'intérêt sur un substrat.

Un mélange et une dispense de réactifs
10 peuvent être obtenus dans des sites d'un substrat avant, pendant ou après la dispense d'une ou de plusieurs cellules sur ce même site.

Ce mode d'éjection permet le mélange de deux liquides (avec ou sans cellules présentes) dans
15 des proportions bien contrôlées, sous la forme de gouttelettes éjectées vers une surface.

Dans le cas d'une dispense de cellules sur une surface, un des deux liquides peut par exemple contenir des réactifs qui agiront sur la cellule après
20 son dépôt sur un site du substrat.

Des cellules individuelles d'un seul ou de plusieurs types cellulaires peuvent être mises en matrice sur un substrat, pour réaliser des puces à cellules par exemple.

25 Des puces à cellules, c'est-à-dire des réseaux à deux dimensions de cellules vivantes, peuvent être produites à l'aide d'un dispositif ou d'un procédé selon l'invention en déposant des cellules individuelles dans des puits ou des trous dans un
30 substrat non-planaire ou dans des « puits virtuels » sur un substrat planaire. Sur une puce à cellules, le

criblage des cellules est mis en oeuvre sur un nombre relativement bien connu de cellules sur chaque site et concerne la détection et la quantification d'une fonction ou d'une caractéristique particulière d'une cellule parmi une population de cellules de différents types cellulaires et/ou à différentes étapes du cycle de division cellulaire. La fonction ou caractéristique cellulaire étudiée est mise en évidence sous l'effet d'un stimulus chimique, optique, électrique,... présent dans le site ou généré à l'extérieur vers la puce. Sur un substrat non-planaire, la densité de sites sur la puce dépend de spécifications physiques telles que l'épaisseur des murs entre deux puits ou deux trous, et/ou l'espace laissé entre deux sites pour des éventuelles connexions microfluidiques.

Une densité de sites très supérieure peut être atteinte en introduisant les cellules dans des puits virtuels réalisés sous forme de gouttes déposées sur un substrat planaire.

Dans le cas où les sites de dispense correspondent à des puits, par exemple des puits virtuels sur un substrat, l'invention est capable de fournir des puces à cellules de très grande densité, c'est-à-dire à des densités très supérieures à celles accessibles à partir du positionnement de cellules dans des plaques à puits ou dans des trous dans le substrat.

Un système selon l'invention peut en outre prévoir un dispositif tel que ci-dessus et un plateau porte-substrat permettant de déplacer un substrat en X, en Y et en Z avec une grande précision.

Ainsi on peut disposer les particules éjectées sur le substrat.

Eventuellement, une enceinte de contrôle de l'atmosphère enferme l'ensemble du dispositif ou du système.

Le dispositif selon l'invention peut aussi être utilisé comme un instrument pour la production de puces et pour toute autre application nécessitant un arrangement spatial particulier d'un nombre contrôlé de cellules sur un substrat.

Par exemple, la faculté de déposer avec précision un nombre varié de produits et d'objets tels que des biopolymères, des cellules de différents types et des facteurs de croissance (stimulants et inhibiteurs) peut s'avérer avantageuse dans le cadre de la régénération de tissus endommagés et la réalisation de tissus artificiels.

Le dispositif selon l'invention permet aussi de détecter et analyser en flux des cellules non-marquées, et intègre la fonction supplémentaire de dispense d'un nombre contrôlé et reproductible de cellules sur des sites.

La sédimentation des cellules dans le dispositif est évitée grâce à une circulation continue des cellules dans le dispositif selon l'invention, tandis que l'entrée d'agrégats cellulaires dans le dispositif selon l'invention peut être empêchée par les petites dimensions du dispositif.

Les volumes dispensés peuvent être réduits au volume minimal nécessaire pour contenir une microparticule, ce qui permet de localiser avec

précision le dépôt de chaque cellule ou particule et de réaliser des puces à cellules possédant une densité très élevée de sites.

Par exemple, on peut générer des
5 gouttelettes de volume compris entre environ 1 femtolitre et 10 μL , ou de diamètre d'environ 0,1 μm à 2 mm ou 5 mm.

L'évaporation du milieu contenant les cellules peut être limitée par la mise en œuvre d'un
10 contrôle de l'atmosphère, en particulier d'un contrôle du degré d'hygrométrie.

Selon un mode de réalisation particulier, un dispositif selon l'invention comporte deux branches de canal principal, et au moins une branche de canal
15 secondaire, qui se rejoignent dans la zone d'intersection.

Par ailleurs, une ouverture d'entrée du premier flux de fluide peut être reliée à une première branche du premier canal, et une ouverture d'injection
20 d'un autre flux de fluide au deuxième canal.

Le dispositif selon l'invention peut comporter au moins une couche déposée à la surface d'un premier et/ou d'un deuxième substrats ou au moins un film intercalaire inséré à l'interface d'une plaque et
25 d'une plateforme, des branches de canal étant creusées ou percées dans la ou lesdites couches ou dans le ou lesdits films intercalaires.

Au moins une ouverture et/ou un orifice peuvent être percés à travers l'épaisseur du substrat
30 de la plateforme et/ou de la plaque.

Chaque couche déposée à la surface de substrat ou chaque film intercalaire inséré à l'interface de la plateforme et de la plaque peuvent être composés d'un ou de plusieurs matériaux choisis
5 parmi le groupe de matériaux comportant les matériaux de gravure du domaine électronique, les résines, les polymères, les matériaux diélectriques, les composés isolants d'éléments semiconducteurs, notamment les résines photosensibles ou électrosensibles, les
10 polyimide, polystyrène, polyéthylène, polyuréthane, polyvinyl, le poly-diméthylsiloxane, les nitrures, les oxydes et les composés de silicium, ainsi que le verre.

Des branches de canal peuvent former des capillaires de dimensions transversales de l'ordre de
15 quelques dizaines de nanomètres (par exemple 20 nm) à quelques millimètres (par exemple 2 mm ou 5 mm).

Les moyens de mesure peuvent être de type optique et/ou électrique, par exemple des moyens de mesure d'impédance du milieu fluide. Ceci peut être
20 réalisé avec une série d'électrodes, par exemple disposées le long d'au moins une branche de canal.

Par exemple, au moins trois microélectrodes sont disposées dans une branche de canal pour mesurer une variation différentielle d'impédance.

25 Les moyens pour engendrer une onde de pression peuvent comporter une électrovanne et/ou un actionneur physico-mécanique apte à générer une onde de pression.

Un dispositif selon l'invention peut être
30 réalisé par assemblage d'une puce microfabriquée comportant des microcanaux et une série de

microélectrodes, et d'une électrovanne qui génère une onde de pression à l'origine de l'éjection des particules à l'extérieur de la puce.

Le volume d'éjection en sortie d'une
5 électrovanne peut être très précis et reproductible.

L'invention concerne également des applications liées à la production de micro-gouttelettes, dont la composition en particules a pu être ajustée ; cette technique permet une dispense
10 sans contact avec un contrôle unitaire de chaque particule, et avec des volumes de micro-gouttelettes d'un à plusieurs ordres de grandeur plus faibles que ceux de l'art antérieur.

Selon un exemple d'application, un premier
15 fluide circulant dans le dispositif comporte par exemple un liquide, ou une solution, ou une suspension ou un milieu contenant des particules ou des cellules biologiques, ou des composants ou des produits cellulaires, notamment des bactéries, ou des lignées
20 cellulaires, ou des globules, ou des noyaux cellulaires, ou des chromosomes, ou des brins d'ADN ou d'ARN, ou des nucléotides, ou des ribosomes, ou des enzymes, ou des protides, ou des protéines, ou des parasites, ou des virus, ou des polymères, ou des
25 facteurs biologiques, ou des stimulants, et/ou des inhibiteurs de croissance.

Parmi les particules, sont notamment concernées des particules solides insolubles dans le liquide, telles que : des particules diélectriques
30 (microbilles de latex par exemple), ou des particules magnétiques, ou des pigments (pigments d'encre par

exemple), ou des colorants, ou des cristaux de protéines, ou des poudres, ou des petites structures de polymères, ou des substances pharmaceutiques insolubles, ou des agrégats (« clusters ») de petite
5 taille formés par agglomération de colloïdes.

Le second flux comporte par exemple des moyens de réaction ou d'interaction avec le premier fluide, notamment au moins un réactif, un principe actif, un marqueur, un milieu nourricier, un produit
10 chimique, un anticorps, une séquence ADN, une enzyme, un protide, une protéine, un facteur biologique, un stimulant ou un inhibiteur de croissance.

BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

D'autres objectifs, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description ci-après de modes de réalisation, donnés à titre d'exemples non-limitatifs, en relation avec les
15 dessins annexés, sur lesquels :

- les figures 1A et 1B représentent des vues ouvertes, lorsque les plaquettes sont démontées, d'un dispositif de dispense de gouttelettes selon l'invention ;
20

- la figure 2 représente une vue de dessus, après assemblage des plaquettes, d'un dispositif selon l'invention ;
25

- la figure 3 représente une vue de face de l'ensemble du dispositif monté avec une électrovanne et un contrepoids, selon l'invention ;

- la figure 4 représente une vue de dessous du dispositif selon l'invention ;
30

- la figure 5 représente une vue d'ensemble d'un système associant un dispositif et une table traçante dans une enceinte, selon l'invention ;

- les figures 6A à 6D représentent des variantes de réalisation de dispositif selon l'invention.

DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE MODES DE RÉALISATION DE L'INVENTION

Un premier exemple d'un dispositif selon l'invention va être décrit en liaison avec la figure 1.

Sur cette figure, le dispositif comporte un substrat 2, par exemple en verre, sur lequel une série d'électrodes 4 est formée.

Une couche 6 recouvre au moins partiellement les électrodes. Cette couche est par exemple en polyimide ou en tout autre matériau pouvant être déposé sous forme de couche mince, en particulier toute résine photosensible ou électrosensible telle que, par exemple, les résines S1818 ou S1813 de la société Shipley ou des résines électrosensibles de polyméthylméthacrylate. Dans cette couche, sont formées une première et une deuxième parties 8, 10 d'un premier microcanal et une première et une deuxième parties 12, 13 d'un deuxième microcanal, de même qu'une ouverture 20, ou orifice d'éjection.

Une portion 14 des micro-électrodes est en contact avec le premier canal 8, 10.

A chaque extrémité des branches de premier canal 8, 10 sont définies des zones 22, 24 plus larges,

qui serviront de points d'entrée et de sortie d'un fluide circulant dans le canal 8, 10.

De même, une ouverture 26, servira de point d'entrée à un second fluide, destiné à circuler dans le deuxième canal 12, 13, en direction de l'orifice d'éjection 20.

Une zone d'intersection 27 se situe entre le point d'entrée 26 du deuxième canal 12 et cet orifice d'éjection 20.

Sur la figure 1A, les parties 12, 13 du deuxième microcanal sont de dimension ou de section comparable au microcanal principal 8, 10, et croisent celui-ci sensiblement à angle droit. Mais un croisement à angle oblique peut aussi être réalisé. Le deuxième microcanal 12, 13 relie le dispositif d'actionnement de l'éjection jusqu'à l'orifice 20 d'éjection des gouttelettes.

L'expression « canal de propulsion » désigne par la suite la partie 12 du deuxième canal qui va de la zone 26 d'introduction jusqu'au canal principal, et l'expression « canal d'éjection » la partie 13 de canal qui va du canal principal 8, 10 vers l'orifice d'éjection 20.

La couche 6 est destinée à être recouverte par un deuxième substrat 28, par exemple lui aussi en verre, comme illustré sur la figure 2.

La figure 1B représente ce deuxième substrat 28. De préférence, ce deuxième substrat 28 est muni d'une couche 6' similaire à la couche 6 du premier substrat 2, munie de motifs 8', 10', 12', 13', 20' reproduisant les canaux 8, 10, 12, 13, 20 et de zones

22', 24', 26' reproduisant les zones 22, 24, 26 d'entrée et de sortie des fluides.

Le dispositif est assemblé en retournant la plaquette de la figure 1B sur celle de la figure 1A.

5 La deuxième couche 6' permet, en combinaison avec la première couche 6, un assemblage efficace des substrats 2, 28.

Le deuxième substrat 28 est muni (figure 2) de trois orifices 32, 34, 36, qui communiquent avec les
10 ouvertures 22, 24, 26 définies dans les couches 6 et 6'.

La figure 3 représente une vue en perspective du dispositif, des flèches 42, 44 symbolisant l'entrée et la sortie d'un premier fluide, par exemple un milieu cellulaire. Sur cette figure,
15 sont également représentés des moyens 40, 41 (ici : une électrovanne) pour appliquer une onde de pression dans le canal 12. Ces moyens sont représentés ici positionnés contre le substrat 28. La flèche 46
20 symbolise l'introduction d'un deuxième fluide à travers ces moyens 40, 41 vers le canal 12. Un contrepoids 48 peut éventuellement être fixé contre le substrat 2 opposé.

Les électrodes 4 peuvent être reliées, par
25 des connexions électriques 5 à des moyens 50 d'analyse (figure 5), par exemple un circuit électronique. Ces moyens sont configurés ou programmés pour détecter le passage de certaines particules ou cellules au niveau des électrodes 4, dans la portion 14 de celles-ci qui
30 traverse le premier canal 8, 10 (voir figure 1).

Avantageusement, les électrodes 4 et les moyens électroniques 50 constituent un dispositif d'analyse par impédancemétrie.

Si, en outre, les substrats 2, 28 sont
5 transparents, des moyens de détection optique peuvent être mis en œuvre, dirigés vers la puce. Un signal produit par ces moyens optiques peut être envoyé vers les moyens de contrôle 50 et utilisé, par exemple seul ou en combinaison avec les signaux provenant des
10 électrodes 4, pour déclencher les moyens 40 d'éjection. Ainsi, on peut mettre en œuvre des techniques de détection optique à l'aide de moyens optiques dirigés entre les électrodes 14 du dispositif. Ces moyens optiques fonctionnent par exemple sur le principe de la
15 diffusion optique au passage des cellules ou des particules.

Il est également possible de faire une analyse optique seule sans recourir aux électrodes. Dans ce cas, un dispositif selon l'invention ne
20 comporte pas nécessairement d'électrodes.

La figure 4 représente une vue du dispositif dans un boîtier ou moule 49, par exemple en plastique. Les références 72, 74, 76 désignent des connexions fluidiques, et les références 51, 53 des
25 connexions électriques.

Le système peut être alimenté de manière continue en fluide à partir d'un réservoir 52 (figure 5) contenant, par exemple, une suspension cellulaire homogène ou hétérogène. Le fluide ou le liquide
30 traverse le dispositif par les branches de canal 8, 10, en ressort par la deuxième ouverture 24 et est collecté

dans un deuxième réservoir 54. Un réservoir 56 contient le fluide qui circule dans les moyens 40, 41 et vers le canal 12.

Le microcanal principal 8, 10 a de
5 préférence une section adaptée au type de particules qui doit être éjecté, par exemple entre un micromètre et trois cents micromètres pour des cellules, et forme en quelque sorte un capillaire. Ainsi, les cellules, circulant dans le microcanal principal 8, passent
10 devant les électrodes 14 et sont analysées une à une, par exemple par impédancemétrie, leurs propriétés électriques étant mesurées en flux à l'aide des électrodes 14. Une série de trois microélectrodes très rapprochées permet de mesurer une variation
15 différentielle d'impédance lors du passage d'une particule et ainsi d'identifier la particule en comparant la mesure au profil d'impédance attendu, comme décrit dans la demande de brevet EP 1335198 et dans le document de Gawad S, Schild L et Renaud Ph,
20 « Lab on a chip » 2001, 1 : 76-82.

Il est donc possible de réaliser l'identification de cellules ou de particules selon des caractéristiques pertinentes, détectées de manière électrique et/ou optique, en particulier sur des
25 critères de taille, de conductivité cytoplasmique et/ou de capacitance membranaire.

Cette technique est très sensible et perçoit, par exemple, l'influence du cytoplasme ou des différences significatives pour des microbilles dont le
30 diamètre diffère de seulement quelques microns. Des opérations de traitement des signaux électriques

enregistrés peuvent être réalisées simultanément par le circuit électronique 50 afin de pouvoir détecter et caractériser les particules en temps réel, ainsi que de dénombrer chaque catégorie identifiée de particules.

5 Cette méthode permet en outre de mesurer la vitesse des particules lors de leur passage devant les électrodes 14. En fonction des résultats de mesure, le dispositif peut être programmé pour paramétrer au cas par cas une décision d'éjection, comme expliqué
10 ci-dessous.

 En effet, les moyens 50 peuvent être configurés ou programmés pour envoyer, en fonction des mesures effectuées, une commande ou un signal vers les moyens 40. Ceux-ci vont alors générer une onde de
15 pression qui, transmise au fluide contenu dans le canal 12, va pousser le fluide provenant du canal 8 et alors situé dans la zone d'intersection 27, vers l'orifice d'éjection 20. Le canal 12, 13 permet de relier le dispositif 40 d'actionnement de l'éjection jusqu'à
20 l'orifice d'éjection 20 des gouttelettes.

 Afin que les moyens 40 ne risquent pas d'être bouchés ou endommagés par le premier fluide circulant dans le canal principal 8, 10, ou par l'accumulation de cellules et de protéines d'un milieu
25 cellulaire contenu dans le premier fluide, ils sont situés en retrait par rapport au canal principal 8, 10. En effet, le deuxième fluide, dans le canal 12 de propulsion, agit alors comme une interface avec le fluide ou le milieu cellulaire circulant dans le canal
30 principal 8, 10.

Le fait que les moyens 40 soient en retrait vis-à-vis du canal principal 8, 10 permet en outre de réduire les contraintes de cisaillement sur les cellules lors de l'éjection et de centrer la majeure
5 partie de l'onde produite vers le canal d'éjection 13.

D'autre part, si les dimensions du microcanal principal 8, 10 sont réduites, des agrégats de cellules, qui pourraient boucher le microdispenseur, ne peuvent accéder aux moyens 40.

10 Une grande précision dans la décision d'éjection peut être atteinte grâce à la faible distance d (figure 1), comprise par exemple entre 5 μm et 15 μm , par exemple égale à environ 10 μm , entre la série d'électrodes 14 et la zone de croisement 27. La
15 série d'électrodes est donc placée le plus proche possible de la zone de croisement 27.

Comme illustré sur la figure 3, la dispense des particules est donc accomplie par l'éjection, hors du dispositif, d'une gouttelette 60, contenant la
20 particule d'intérêt, par exemple vers un site d'un substrat. La position relative d'un dispositif selon l'invention et d'un tel substrat 71 est en fait illustrée sur la figure 5. L'éjection des particules d'intérêt permet un tri des particules en fonction de
25 critères préétablis par l'opérateur.

La détection et l'éjection des particules d'intérêt peuvent être coordonnées grâce aux moyens 50 qui peuvent analyser, en temps réel, les signaux électriques mesurés entre les électrodes 4. En
30 particulier, la largeur et/ou l'instant de déclenchement et/ou la forme et/ou l'intensité d'un

signal de commande peuvent être adaptés par les moyens 50. En conséquence, chaque gouttelette 60 produite contient une microparticule d'intérêt, et peut être éjectée vers un récipient particulier ou vers un site
5 particulier sur un substrat.

Un procédé de dispense à la demande selon l'invention met donc en œuvre une onde de pression exercée, dans l'exemple donné, par une vanne miniature 40 (figure 3) commandée électriquement par un
10 microsolénoïde, le tout étant piloté par les moyens 50.

Selon un mode particulier de réalisation une électrovanne peut être intégrée directement sur la puce par des techniques de microfabrication. D'autres moyens peuvent aussi être utilisés pour générer l'onde
15 de pression à la place de l'électrovanne. Par exemple, des dispenseurs à la demande de type piézoélectrique, ou acoustique, ou électromécanique, ou pneumatique, ou actionné par une bulle d'air ou de solvant peuvent être utilisés, en remplaçant la vanne miniature à
20 l'extrémité du canal 12 de propulsion par un matériau piézoélectrique, ou un transducteur électroacoustique, ou un actionneur mécanique, ou un piston, ou une résistance chauffante.

Dans le cas d'une dispense à la demande de type thermique, l'éloignement relatif de la résistance chauffante (du fait de la portion de canal 12 qui sépare les moyens 40 du canal principal 8, 10) évite d'endommager les cellules et favorise ainsi leur taux de survie.

30 Lorsqu'une particule est détectée par les moyens 50 comme vérifiant des critères spécifiés, une

impulsion de pression est appliquée par les moyens 40 et une gouttelette 60 est éjectée à travers l'orifice d'éjection. L'onde de pression à la base de l'éjection est générée par un second fluide ou liquide 46 propulsé par les moyens 40 (figure 3). Ce fluide, ou liquide, est conduit à travers le canal de propulsion 12 en vis-à-vis du canal d'éjection 13, traverse le canal principal 8, 10 et est expulsé à travers l'orifice d'éjection 20. Par ce mouvement, une portion de liquide est extraite du canal principal et poussée vers l'orifice d'éjection 20 selon une direction sensiblement perpendiculaire à son déplacement initial, ou selon une autre direction si le canal d'éjection et le canal principal ne se croisent pas à angle droit. L'élément de volume éjecté du canal principal contient la fraction d'intérêt uniquement, en particulier l'élément de volume qui renferme la cellule ou particule d'intérêt.

En dehors de toute éjection, le canal d'éjection 13 est rempli par action capillaire. Le liquide est retenu par sa tension de surface au niveau de l'orifice d'éjection 20. Ce second liquide, propulsé par les moyens 40, est initialement au repos dans le canal de propulsion.

L'application d'une impulsion de pression produit l'éjection d'une gouttelette dont le volume est fixé par la forme et la durée de l'impulsion.

Pour une impulsion identique, le même volume est dispensé quelles que soient la densité, la viscosité et la tension de surface du liquide et les variations éventuelles des conditions atmosphériques.

Le volume dispensé peut être contrôlé précisément en ajustant, à l'aide des moyens 50, par exemple programmés à cet effet, l'instant de déclenchement et/ou la durée d'ouverture et/ou la forme
5 et/ou l'intensité de l'impulsion électrique pilotant les moyens 40. Le volume éjecté est par exemple compris entre 0,1 pL et 10 µL, en fonction des dimensions des canaux et des paramètres d'impulsion de l'électrovanne.

Un mode d'utilisation du microdispenseur
10 selon l'invention est donc la production de gouttelettes dont chacune contient une microparticule d'intérêt.

Le microdispenseur selon l'invention intègre les fonctions de chargement du liquide,
15 d'analyse des microparticules ou des cellules vivantes non-marquées, de séparation et d'éjection des cellules ou particules d'intérêt, et de sortie du liquide avec les cellules ou particules refusées.

Les microparticules d'intérêt peuvent être
20 détectées et analysées en flux par impédancemétrie (détection électrique) et/ou par détection optique en amont de la zone d'éjection. Le mode d'éjection des gouttelettes peut être du type à la demande (DOD, « Drop On Demand ») et sans contact, produisant une
25 dispense à partir d'un flux, de l'élément de volume d'intérêt, c'est-à-dire contenant une microparticule sélectionnée.

La figure 5 représente un système 70 porte-substrat, de type table traçante qui régit les
30 déplacements d'un substrat 71 en X, en Y et en Z, avec une certaine précision (de préférence micrométrique),

dans l'objectif de réceptionner les gouttelettes 60 contenant chacune une cellule sur des sites adéquats d'un substrat. Les déplacements de la table traçante peuvent être coordonnés avec les éjections de
5 gouttelettes, à l'aide des moyens 50. En particulier les positions du plateau porte-substrat sous la buse d'éjection peuvent être pilotées en fonction du type de cellule ou de particule détecté. L'identification de la microparticule, à l'aide des moyens 50, permet à la
10 fois l'opération de dispense ou d'éjection et le positionnement du site sur le substrat.

Un autre mode d'utilisation d'un dispositif selon l'invention est l'éjection d'une série de gouttelettes dont l'une contient la microparticule.
15 L'alignement de la tête de dispense et du substrat 71 permet de contrôler le nombre de gouttelettes déposées dans chaque site et, si nécessaire, d'ajouter ultérieurement de nouvelles gouttelettes sur les sites dispensés.

20 La concentration de particules sur un site du substrat dépend du nombre de gouttelettes dispensées, en particulier la concentration de particules peut être inférieure ou supérieure à la concentration initiale dans le réservoir.

25 En outre, le dispositif permet d'ajouter, de façon ponctuelle ou régulière, du solvant et/ou des réactifs avec une très grande précision, par exemple dans le cadre d'expériences dépendant du temps.

Le liquide 46 propulsé par les moyens 40
30 peut être le même ou non que le liquide dans le canal principal 8, 10 qui contient les particules. Une

possibilité de mélange de deux liquides au moment de l'éjection est incluse lorsque les deux liquides sont différents ou si le liquide propulsé par l'électrovanne contient un produit particulier.

5 Cette fonction de mélange permet par exemple d'introduire des réactifs dans la gouttelette contenant une cellule, qui agiront sur la cellule après le dépôt sur le site. Un mélange ultérieur est également possible avec le même dispositif, en déposant
10 de nouvelles gouttelettes sur des sites déjà existants sur un substrat 71.

 A titre d'exemple, les réactifs peuvent être des principes actifs, des marqueurs immunofluorescents ciblant des antigènes spécifiques,
15 des marqueurs de métabolisme ou de viabilité tels que le bleu trypan, ou des produits toxiques, ou des séquences ADN pour une transfection des cellules.

 Les réactifs peuvent également être des protéines, par exemple des enzymes telles que la
20 trypsine. Le dépôt de deux types cellulaires sur le même site permet de réaliser l'étude d'interactions cellule-cellule. Le dispensateur peut également être connecté en amont ou en aval avec d'autres dispositifs d'analyse en flux tels que par exemple l'électrophorèse
25 capillaire et/ou la spectroscopie de masse.

 Le microdispenseur selon l'invention peut être réalisé à l'aide des techniques conventionnelles de microfabrication en salle blanche. Un exemple de procédé de réalisation va être décrit.

30 Un premier masque optique est employé pour produire les motifs des microélectrodes dans une

photorésine (par exemple disponible sous la référence commerciale « AZ5214 ») sur une plaquette en verre, par exemple de quatre pouces (soit 10 cm environ), et déposer une bicouche métallique de 50 nm de titane et
5 de 150 nm de platine par pulvérisation cathodique.

Les microélectrodes 14 ont une largeur de 20 μm , une distance inter-électrode comprise entre 20 μm et 50 μm , et s'étendent jusqu'à des plots 5 de contact électrique situés sur le côté opposé de la puce
10 (figure 1).

Le microdispenseur peut être fabriqué en assemblant deux puces identiques l'une sur l'autre, à la différence que des microélectrodes 14 peuvent n'être réalisées que sur l'une d'entre elles. Les
15 microélectrodes peuvent donc être produites sur un côté seulement de la plaquette de verre, par exemple le côté gauche tandis qu'aucune électrode n'est fabriquée sur le côté droit.

Les microcanaux sont définis dans une photorésine de polyimide (PI-2732, Dupont) grâce à un
20 second masque optique. Les dimensions du microcanal principal 8, 10, du canal 12 de propulsion et du canal 13 d'éjection sont de préférence semblables dans la zone de croisement 27, avec une section adaptée au type
25 de particules qui doit être éjecté. La largeur des microcanaux est typiquement comprise entre 1 μm et 300 μm . La hauteur des canaux, déterminée par l'épaisseur des couches 6, 6' de polyimide, peut être
30 comprise entre 100 nm et 75 μm ; puisque le microdispenseur peut être obtenu par assemblage de deux puces d'épaisseur identique, il suffit de déposer une

épaisseur de polyimide égale à la moitié de celle recherchée (entre 50 nm et 38 μ m).

Les épaisseurs de polyimide 6, 6' peuvent être comprises entre 15 μ m et 25 μ m, et les épaisseurs des canaux obtenus dans cette couche 6, 6' entre 30 μ m et 50 μ m, tandis que les largeurs des canaux sont comprises entre 50 μ m et 100 μ m dans la zone 27 de croisement des microcanaux. La plaquette de verre est découpée en deux morceaux, l'un portant les microélectrodes, l'autre n'en portant aucune. Les deux morceaux sont alignés l'un sur l'autre pour former les microcanaux et assemblés par un recuit thermique à 300°C sous atmosphère d'azote.

Les puces sont découpées pour séparer les microdispenseurs et dégager les plots des microélectrodes. Trois ouvertures sont produites dans chaque dispositif par électroérosion avec une pointe en tungstène : deux ouvertures à chaque extrémité du microcanal principal constituent l'entrée et la sortie du solvant contenant les microparticules, la troisième ouverture près du centre du microdispenseur est dédiée au positionnement de l'électrovanne. Dans une configuration, l'ouverture 36 pour l'électrovanne est réalisée sur la plaquette de verre 2 qui porte les électrodes 14, 4, 5. Dans une autre configuration illustrée figure 2, l'ouverture 36 pour l'électrovanne 40 est réalisée sur la plaquette de verre 28 opposée à la plaquette 2 qui porte les électrodes 14, 4, 5 et qui forme la plateforme. Chacune des ouvertures 32, 34, 36 peut être réalisée d'un côté quelconque du microdispenseur, en particulier les ouvertures 32, 34

pour l'entrée et la sortie du solvant et l'ouverture 36 de l'électrovanne peuvent être situées du même côté ou placées en opposition.

L'électrovanne employée est par exemple une
5 vanne de microdispense VHS Small Port INKA 4026212H (The Lee Company, Westbrook, USA), avec un orifice de sortie de 100 μ m de diamètre interne, maintenue contre la puce avec un joint étanche de polydiméthylsiloxane (PDMS) ou avec un joint torique (« O-Ring ») en
10 plastique. L'assemblage électrovanne-puce est stabilisé en maintenant un contrepoids 48 sur la puce du côté opposé de l'électrovanne, ce qui permet de supporter fermement la puce dans le plan vertical et d'éjecter des gouttelettes vers le bas. L'électrovanne 40 et le
15 contrepoids 48 sont soutenus dans la direction orthogonale au plan de la puce grâce à un moule 49 de plastique qui englobe la puce, l'électrovanne, le contrepoids et les connexions fluidiques aux réservoirs.

20 Le dessin du microdispenseur est de préférence symétrique par rapport à l'axe formé par les canaux de propulsion 12 et d'éjection 13 : les canaux 8, 10 et les microélectrodes 14 sont reproduites à l'identique par rapport à cet axe de symétrie. Dans
25 cette configuration, l'entrée et la sortie sont interchangeables puisque une détection des microparticules peut être effectuée des deux côtés du microdispenseur. En outre, la présence de microélectrodes 14 après le canal d'éjection 13 permet
30 de suivre les déplacements des cellules ou particules qui n'ont pas été sélectionnées pour l'éjection.

Un suivi optique des déplacements des microparticules peut également être réalisé à travers les deux faces du microdispenseur, lorsque celui-ci est fabriqué à partir d'une plaquette de verre (matériau transparent). En particulier, l'observation optique des microparticules est profitable lors des premiers ajustements effectués pour coordonner la détection électrique des cellules ou particules et le déclenchement de l'ouverture de l'électrovanne.

10 Dans une autre configuration illustrée par exemple sur la figure 6C, les microélectrodes 63, 65 sont disposées des deux côtés du microdispenseur. Dans ce cas, la différence d'impédance est mesurée entre deux électrodes 63, 65 en vis-à-vis, comme spécifié
15 dans le document de Gawad S et coll., « Lab on a chip » 2001, 1 : 76-82.

Dans une autre configuration, l'électrovanne 40 est placée au-dessus du microcanal principal, et les canaux de propulsion 66 et d'éjection
20 68 consistent en des ouvertures réalisées à travers les substrats en verre 28 et 2, comme illustré sur les figures 6A à 6D. Dans ce cas, l'éjection de gouttelettes 60 est produite directement dans l'axe de l'électrovanne 40.

25 Plusieurs types de matériaux sont possibles pour les substrats du microdispenseur et pour réaliser les microcanaux, mais les matériaux utilisés sont de préférence isolants (pour ne pas perturber l'analyse électrique) et biocompatibles : résines photosensibles
30 ou électrosensibles, polymères (polystyrène, polyéthylène, polyuréthane, poly(diméthylsiloxane)

(PDMS), poly(vinyl chloride),...), couches isolantes déposées par dépôt chimique en phase vapeur (CVD, « Chemical Vapor Deposition ») telles que des couches de Si_3N_4 ou de SiO_2 ,...

5 Une possibilité est de réaliser les microcanaux directement dans le substrat en verre par gravure chimique au BHF (acide fluorhydrique tamponné) ou au HF (acide fluorhydrique) dilués et de sceller les deux puces par collage ou par soudure directe.

10 L'invention décrite est très flexible et s'adapte aux spécifications recherchées par l'utilisateur. En particulier, le dispositif peut être utilisé pour une partie seulement de ses fonctions.

Par exemple, une application est le simple
15 dénombrement en flux des cellules sans éjection ultérieure. Une autre opération possible est la caractérisation et le dénombrement en flux des cellules sans éjection. Le dénombrement peut être effectué à l'aide des moyens 50 qui comptabilisent les particules
20 ou les cellules présentant des caractéristiques données, mesurées à l'aide des moyens de mesure électriques et/ou optiques tels que décrits ci-dessus.

Une application est la dilution de particules : les gouttelettes 60 sont formées par
25 mélange du liquide circulant dans le premier canal et du liquide propulsé par le système produisant l'onde de pression (par exemple une électrovanne). Le volume des gouttelettes est proportionnel au temps d'ouverture du système produisant l'onde de pression. Une dilution
30 peut ainsi être effectuée en augmentant le volume de la gouttelette éjectée.

Une autre possibilité de dilution concerne la gouttelette déposée sur le substrat, constituée de plusieurs gouttelettes plus petites éjectées par le dispensateur. Certaines des gouttelettes éjectées peuvent
5 correspondre à des gouttelettes « vides », c'est-à-dire à des gouttelettes sans cellules ou particules, qui augmentent le volume de la gouttelette sur le substrat et donc diluent les composants qui y sont contenus.

Une autre application concerne le tri et
10 l'éjection des cellules vers un ou plusieurs récipients sans disposition particulière des cellules sur un substrat.

Plus généralement, le tri concerne la possibilité de laisser les cellules ou particules
15 circuler vers la sortie 24 du premier canal (figure 1A) ou de les propulser à l'extérieur du dispensateur sous forme de gouttelettes. La séparation des cellules ou particules vers deux sorties est donc réalisée au niveau de l'intersection 27 des deux canaux, en
20 fonction des signaux enregistrés par le système de détection.

Une autre forme de tri consiste à positionner un substrat 71 en fonction de la cellule contenue dans la gouttelette éjectée afin que les
25 cellules soient collectées dans des récipients différents selon le type cellulaire. Ceci permet d'obtenir des cultures cellulaires purifiées dans des récipients particuliers.

L'invention permet de délivrer des nombres
30 précis de cellules vers des récipients ou vers des sites déterminés sur un substrat, par exemple pour des

applications de tri et/ou de distribution et/ou de dosage et/ou de transfert d'échantillons.

Le microdispenseur peut être employé pour extraire une ou quelques cellules du milieu avec la
5 possibilité de contrôler précisément le volume de liquide qui les contient, et par conséquent de concentrer les cellules sur le site ou bien de les diluer par ajout sur le site de gouttelettes supplémentaires sans cellules.

10 Le matriçage des cellules sur un substrat peut concerner une ou plusieurs cellules sur chaque site. Dans le cas de sites contenant plusieurs cellules, un seul ou plusieurs types cellulaires peuvent être déposés sur un même site.

15 Des gouttelettes sans cellules peuvent être volontairement ajoutées dans des sites du substrat, que ceux-ci contiennent des cellules ou non, par exemple pour délivrer des réactifs en quantité très précise sur le site ou pour compenser l'évaporation du liquide sur
20 le substrat.

De façon avantageuse, la taille réduite du dispositif (1 cm à 3 cm de côté) permet la manipulation de volumes réduits de suspension cellulaire, par exemple pour prélever des échantillons rares ou
25 précieux, ou pour extraire des cellules en très petite quantité diluées dans un volume relativement grand de liquide. La concentration cellulaire initiale dans le réservoir peut être faible et adaptée au nombre total de cellules qui doivent être dispensées, ce qui permet
30 de réaliser des dispenses de cellules à partir de petits échantillons extraits de milieux cellulaires

plus importants. Le microdispenseur permet potentiellement de dispenser toutes les cellules d'intérêt d'un milieu, si nécessaire (par exemple si le nombre de cellules est élevé et ne permet pas de déclencher toutes les opérations d'éjection pendant un seul passage) en mettant en œuvre une connexion en boucle de la sortie et de l'entrée du dispenseur afin de réaliser plusieurs passages successifs du milieu dans le dispositif.

10 Comme illustré sur la figure 5, l'ensemble de l'instrumentation 49, 50, 52, 54, 56 du dispositif et de la table traçante 70, 71 est placé dans une enceinte 500 pour le contrôle de l'atmosphère, c'est-à-dire le contrôle de l'humidité, de la pression et de la température. Une meilleure fiabilité et une meilleure précision sont obtenues lors de la production des spots grâce à une réduction des mouvements de l'air pendant la dispense. De plus, le contrôle des conditions environnementales permet de générer un degré d'hygrométrie de l'air supérieur à 80 % et minimise ainsi l'évaporation des gouttes sur les sites du substrat. D'une manière générale, l'évaporation à l'air ambiant des gouttes de milieu cellulaire est d'environ 3 nL/min pour des volumes dispensés de l'ordre de 10 nL, et donc la mise en place d'un système d'air fortement chargé en humidité permet de conserver les gouttes produites au moins deux semaines sans grande variation de leur volume.

REVENDICATIONS

1. Dispositif de dispense de gouttelettes
comprenant :

- un premier canal (8, 10), dit canal
5 principal, comprenant au moins une branche, pour une
circulation d'un premier flux de fluide,
- un deuxième canal (12, 13) de circulation
de fluide, comprenant au moins une branche, qui forme
avec le premier canal une zone d'intersection (27) et
10 qui se termine par un orifice d'éjection (20),
- des moyens (4, 14) de mesure d'une
propriété physique de particules ou de cellules dans le
premier canal, et
- des moyens (40) pour engendrer une onde
15 de pression dans le deuxième canal.

2. Dispositif selon la revendication 1
comportant deux branches (8, 10) du canal principal, et
au moins une branche de canal secondaire, qui se
20 rejoignent dans la zone d'intersection (27).

3. Dispositif selon la revendication 2
comportant une ouverture (22) d'entrée du premier flux
de fluide reliée à une première branche (8) du premier
25 canal, et une ouverture (26) d'injection d'un autre
flux de fluide dans le deuxième canal.

4. Dispositif selon l'une des
revendications 1 à 3, dans lequel le deuxième canal
30 comporte des branches (12, 13) de part et d'autre du
canal principal (8, 10).

5. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 4, dans lequel, outre l'orifice d'éjection de gouttelettes (20) qui fournit une sortie d'une partie de flux, le dispositif comporte un autre orifice (24) de sortie d'une autre partie de flux.

6. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 5 comportant une plateforme (2) d'un premier substrat et une plaque (28) d'un deuxième substrat recouvrant la plateforme, dans, ou sur ou entre lesquelles ou à l'interface desquelles, sont aménagées les branches (8, 10, 12, 13) de canal.

7. Dispositif selon la revendication 6 comportant en outre au moins une couche (6, 6') déposée à la surface du et/ou des substrats (2, 28) ou au moins un film intercalaire inséré à l'interface de la plaque (28) et de la plateforme (2), les branches (8, 10, 12, 13) de canal étant creusées ou percées dans la ou lesdites couches ou dans le ou lesdits films intercalaires.

8. Dispositif selon la revendication 7, dans lequel chaque couche (6, 6') déposée à la surface de substrat (2, 28) ou chaque film intercalaire inséré à l'interface de la plateforme (2) et de la plaque (28) sont composés d'un ou de plusieurs matériaux choisis parmi le groupe de matériaux comportant les matériaux de gravure du domaine électronique, les résines, les polymères, les matériaux diélectriques, les composés

isolants d'éléments semi-conducteurs, notamment les
résines photosensibles ou électrosensibles, les
polyimide, polystyrène, polyéthylène, polyuréthane,
polyvinyl, poly-diméthylsiloxane, les nitrures, les
5 oxydes et les composés de silicium, ainsi que le verre.

9. Dispositif selon l'une des
revendications 6 à 8 dans lequel au moins une ouverture
et/ou un orifice (32, 34, 36, 62, 64, 66, 68) sont
10 percés à travers l'épaisseur du substrat de la
plateforme (2) et/ou de la plaque (28).

10. Dispositif selon l'une des
revendications 6 à 9, dans lequel le substrat de la
15 plateforme et/ou de la plaque (2, 28) est en verre.

11. Dispositif selon la revendication 10,
dans lequel au moins un orifice (34, 64, 68) et/ou une
ouverture (32, 62, 68) et/ou au moins une branche de
20 canal (8, 10, 12, 13, 66, 68) sont percés ou creusés
dans le substrat en verre.

12. Dispositif selon l'une des
revendications 1 à 11, dans lequel les branches de
25 canal (8, 10, 12, 13) forment des capillaires de
dimensions transversales de l'ordre de quelques
dizaines de nanomètres à quelques millimètres.

13. Dispositif selon l'une des
30 revendications 1 à 12, comportant des moyens de mesure
de propriétés optiques d'un flux de fluide.

14. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 13, comportant des moyens (4, 5, 14) de mesure de paramètres électriques d'un flux de fluide.

15. Dispositif selon la revendication 14, dans lequel une zone de mesure des paramètres électriques est disposée à proximité de la zone d'intersection (27).

16. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 15, comportant des moyens de mesure d'impédance du milieu.

17. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 16, les moyens de mesure comportant une série d'électrodes (5, 4, 14).

18. Dispositif selon la revendication 17, dans lequel des électrodes (14, 63, 65) sont disposées le long d'au moins une branche de canal (8, 10).

19. Dispositif selon la revendication 16 ou 17, dans lequel des électrodes appariées (63, 65) sont disposées de part et d'autre d'une branche de canal (8, 10).

20. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 19, dans lequel au moins trois microélectrodes (14) sont disposées dans une branche de

canal (8) pour mesurer une variation différentielle d'impédance.

21. Dispositif selon l'une des
5 revendications 1 à 20, caractérisé en ce qu'il comporte une électrovanne (40) et/ou un actionneur physico-mécanique apte à générer une onde de pression et/ou un flux.

10 22. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 21, comportant des moyens (50) de commande pour recevoir des signaux de mesure issus des moyens (4) de mesure de propriétés physiques, et pour
15 envoyer un signal de commande vers les moyens (40) pour engendrer une onde de pression.

23. Dispositif selon la revendication 22, dans lequel les moyens de commande (50) sont aptes à contrôler l'amplitude et/ou l'instant de déclenchement,
20 et/ou la forme, et/ou la durée du signal de commande.

24. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 23, comprenant en outre des moyens (52, 54) d'alimentation et/ou de circulation continue
25 de fluide dans le canal principal.

25. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 24, comprenant en outre au moins un réservoir (52, 54) relié à une branche de canal
30 respective (8, 10), destiné à contenir un liquide,

notamment un liquide ou un milieu comprenant une solution ou une suspension cellulaire.

26. Dispositif selon l'une des
5 revendications 1 à 25, comprenant en outre une enceinte de confinement (500).

27. Système de dépôt d'au moins un
échantillon (60) sur un substrat (71) comprenant un
10 dispositif de dispense de gouttelettes selon l'une des revendications précédentes, associé à des moyens de balayage ou de déplacement relatif (70) du substrat et du dispositif de dispense permettant de déposer les gouttelettes éjectées (60) de place en place sur le
15 substrat (71).

28. Procédé de dispense de gouttelettes (60), mettant en œuvre un premier canal (8, 10) et un deuxième canal qui forme avec le premier canal une zone
20 d'intersection (27) et qui se termine par un orifice d'éjection (20), le procédé comportant des étapes consistant à :

- mettre un premier fluide en circulation dans le premier canal ;
- 25 - mesurer une propriété physique ou analyser le contenu du flux du premier fluide ; et,
- en fonction des résultats de l'étape précédente, engendrer une onde de pression.

30 29. Procédé selon la revendication 28 comportant une étape consistant à injecter un second

flux de fluide dans ou vers la zone d'intersection de manière conjointe avec l'étape de génération d'une onde de pression.

5 30. Procédé selon la revendication 29, comportant des étapes consistant à :

- alimenter une ouverture d'entrée (32) d'une branche du canal (8) par un flux continu du premier fluide.
- 10 - alimenter une ouverture d'injection (26,36) communiquant avec la zone d'intersection (27) par un flux du second fluide ;

15 31. Procédé selon l'une des revendications 29 ou 30, dans lequel on recueille une dilution ou un mélange du premier fluide et du second fluide à une ouverture de sortie (34) du canal ou à l'orifice (20) d'éjection de gouttelettes.

20 32. Procédé selon l'une des revendications 29 à 31, dans lequel le second flux injecté est composé d'un autre fluide que le premier fluide.

25 33. Procédé selon l'une des revendications 29 à 31, dans lequel le second flux injecté est composé d'un fluide, ou d'un liquide, ou d'un solvant et/ou d'un milieu identique au premier fluide.

30 34. Procédé selon l'une des revendications 29 à 33, dans lequel le second flux comporte des moyens de réaction ou d'interaction avec le premier fluide,

notamment au moins un réactif et/ou un principe actif, et/ou un marqueur, et/ou un milieu nourricier, et/ou un produit chimique, et/ou un anticorps, et/ou une séquence ADN, et/ou une enzyme, et/ou un protide, et/ou
5 une protéine, et/ou un facteur biologique, et/ou un stimulant, et/ou un inhibiteur de croissance.

35. Procédé selon l'une des revendications 29 à 34, comportant une étape consistant à :

10 - délivrer une commande électrique calibrée pour injecter le second flux de fluide vers la zone d'intersection.

36. Procédé selon la revendication 35, dans
15 lequel la commande électrique a une amplitude et/ou un instant de déclenchement et/ou une forme et/ou une durée d'impulsion contrôlée afin d'éjecter une gouttelette de volume contrôlé ou calibré.

20 37. Procédé selon l'une des revendications 28 à 36, dans lequel on recueille une concentration, une séparation, et/ou une extraction, et/ou une sélection et/ou une collection de composants du premier fluide à l'orifice d'éjection de gouttelettes ou à
25 l'ouverture de sortie du canal.

38. Procédé selon l'une des revendications 28 à 37, dans lequel le premier fluide comporte un liquide, ou une solution, ou une suspension ou un
30 milieu contenant des cellules biologiques, et/ou des composants et/ou des produits cellulaires, notamment

des bactéries, et/ou des lignées cellulaires, et/ou des globules, et/ou des noyaux cellulaires, et/ou des chromosomes, et/ou des brins d'ADN ou d'ARN, et/ou des nucléotides, et/ou des ribosomes, et/ou des enzymes, et/ou des protides, et/ou des protéines, et/ou des parasites, et/ou des virus, et/ou des polymères, et/ou des facteurs biologiques, et/ou des stimulants, et/ou des inhibiteurs de croissance.

10 39. Procédé selon l'une des revendications 28 à 38, dans lequel le premier fluide comporte un liquide ou une solution, ou une suspension, ou un milieu contenant des particules.

15 40. Procédé selon la revendication 39, les particules étant des particules solides insolubles dans le liquide, telles que des particules diélectriques ou des particules électriques, ou des particules magnétiques, ou des pigments, ou des colorants, ou des cristaux de protéines, ou des poudres, ou des structures de polymères, ou des substances pharmaceutiques insolubles, ou des clusters ou agrégats de petite taille formés par agglomération de colloïdes.

25 41. Procédé selon l'une des revendications 28 à 40, comportant une étape intercalaire consistant à :

 - déclencher une impulsion de commande d'éjection de gouttelettes au moment du passage d'un contenu d'intérêt.

42. Procédé selon l'une des revendications 28 à 41, comportant une étape intercalaire consistant à :

- effectuer une analyse cytométrique du flux du premier fluide pour détecter des particules ou des cellules biologiques, des composants ou des produits cellulaires contenus dans le flux ; et,
- déclencher une impulsion de commande d'éjection de gouttelettes pour isoler les particules ou les cellules biologiques, les composants ou les produits cellulaires, détectés.

43. Procédé selon l'une des revendications 28 à 42, l'étape de mesure comportant au moins une mesure de paramètre électrique et/ou une mesure d'impédance ou de variation différentielle d'impédance du contenu du flux du premier fluide circulant dans le canal.

44. Procédé selon l'une des revendications 28 à 43, l'étape de mesure comportant une mesure optique du contenu du flux du premier fluide circulant dans le canal.

45. Procédé selon l'une des revendications 28 à 44, dans lequel on génère des gouttelettes de faible volume, notamment de l'ordre du femtolitre au microlitre, ou de diamètre micrométrique, de l'ordre de 0,1 μm à quelques millimètres.

46. Procédé selon l'une des revendications 28 à 45, dans lequel on éjecte des gouttelettes de fluide (60) de place en place sur un substrat (71) ou un support (70).

5

47. Procédé selon l'une des revendications 28 à 46, caractérisé en ce qu'il est mis en œuvre dans une atmosphère confinée (500).

10

48. Procédé selon l'une des revendications 28 à 47, appliqué à une extraction, une sélection et/ou un tri de lignées cellulaires.

15

49. Procédé selon l'une des revendications 28 à 48, appliqué à une détection, et/ou une identification, et/ou un dénombrement, et/ou une caractérisation de particules ou de cellules biologiques, de composants ou de produits cellulaires.

20

50. Procédé selon l'une des revendications 28 à 49, appliqué au dépôt de particules ou de cellules biologiques, ou de composants ou de produits cellulaires, sur des sites privilégiés d'implantation et/ou de croissance et/ou de régénération et/ou de greffe, notamment des lignées cellulaires, ou des biopolymères, ou des facteurs biologiques, ou des stimulants ou des inhibiteurs de croissance.

25

51. Procédé selon l'une des revendications 28 à 50, appliqué à la dispense de microflux de réactif biologique ou chimique aux endroits correspondants où

30

sont dispensées des gouttelettes contenant des composants biologiques actifs, la dispense de réactif s'effectuant soit pendant la dispense des composants biologiques actifs soit par dispense différée d'autres
5 gouttelettes sur des sites sur lesquels les gouttelettes de composants biologiques actifs ont été déposées auparavant ou seront déposées après.

52. Procédé de comptage de particules,
10 mettant en œuvre un dispositif selon l'une des revendications 1 à 26, un fluide contenant des particules circulant dans le premier canal, et les particules étant comptées à l'aide des moyens de mesure (4, 14) ou de moyens optiques.

1/5

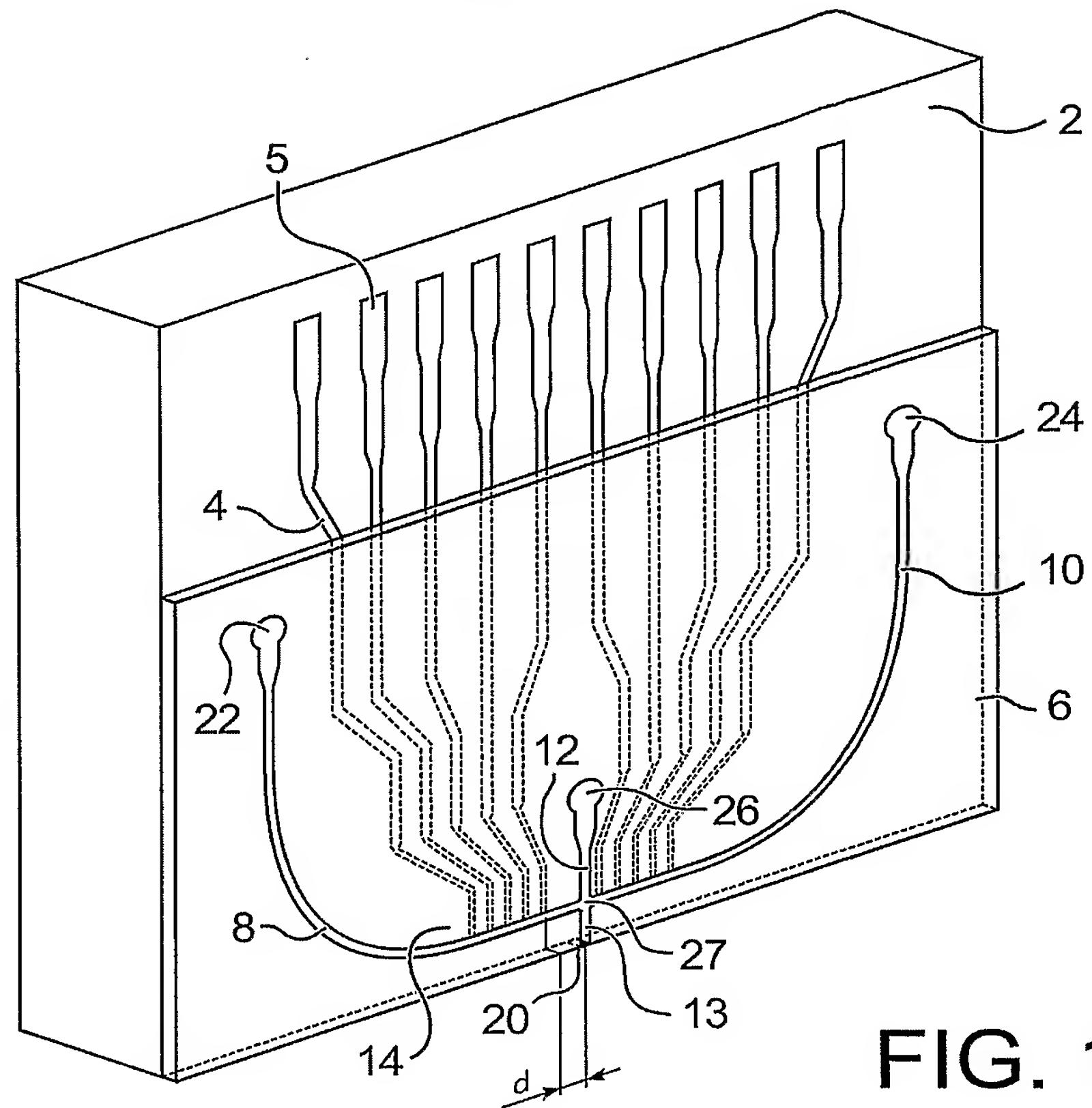


FIG. 1A

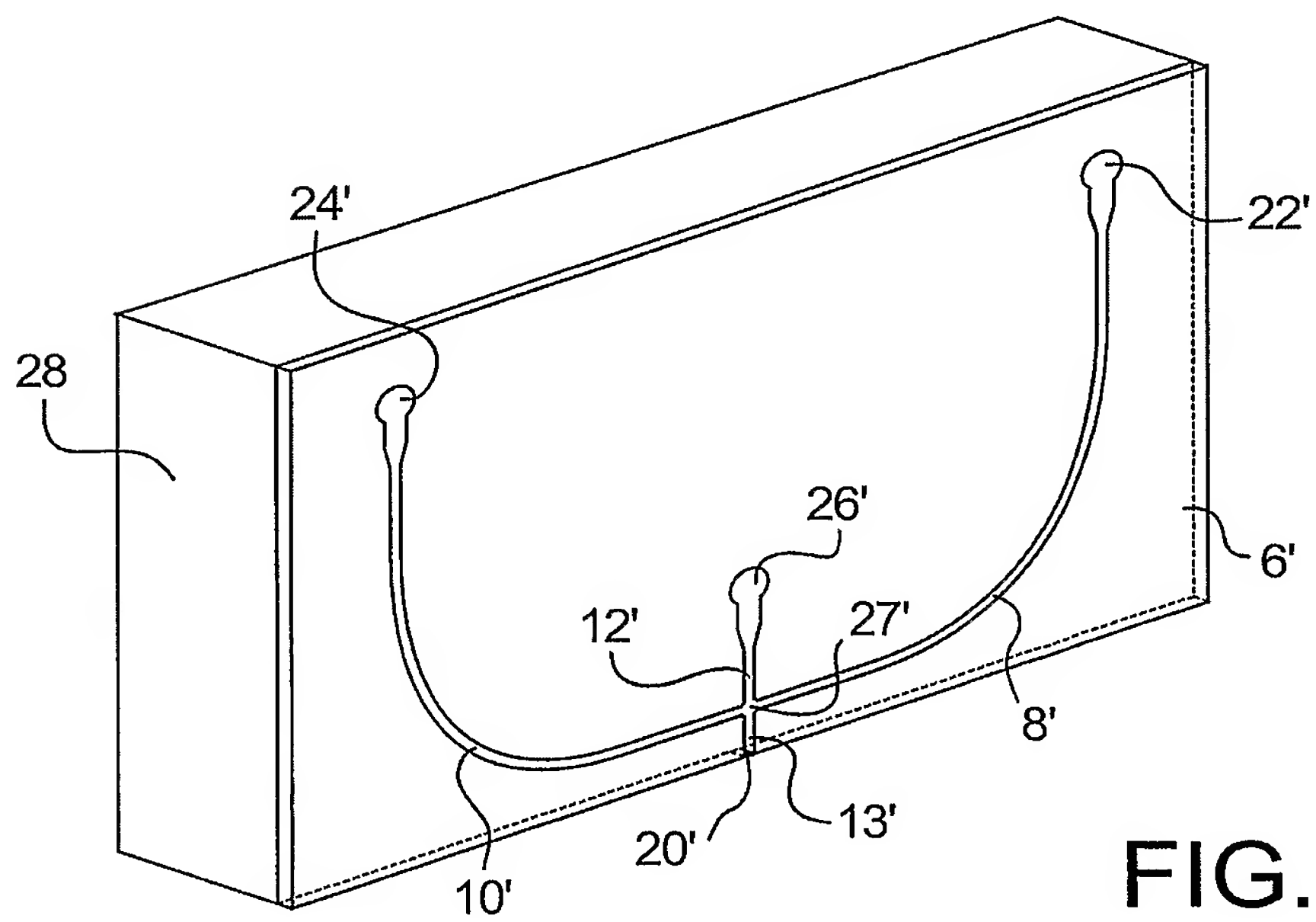


FIG. 1B

2/5

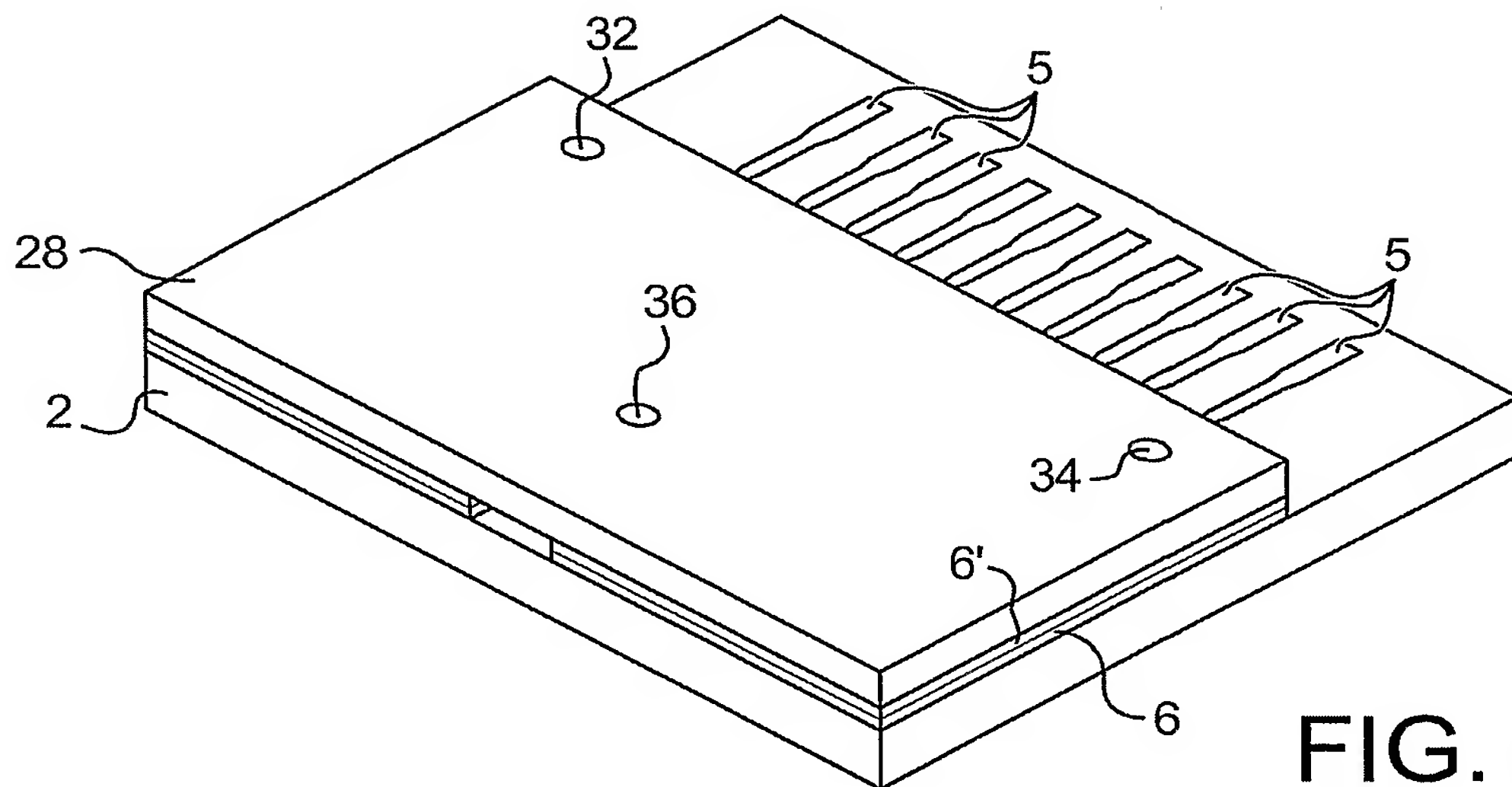


FIG. 2

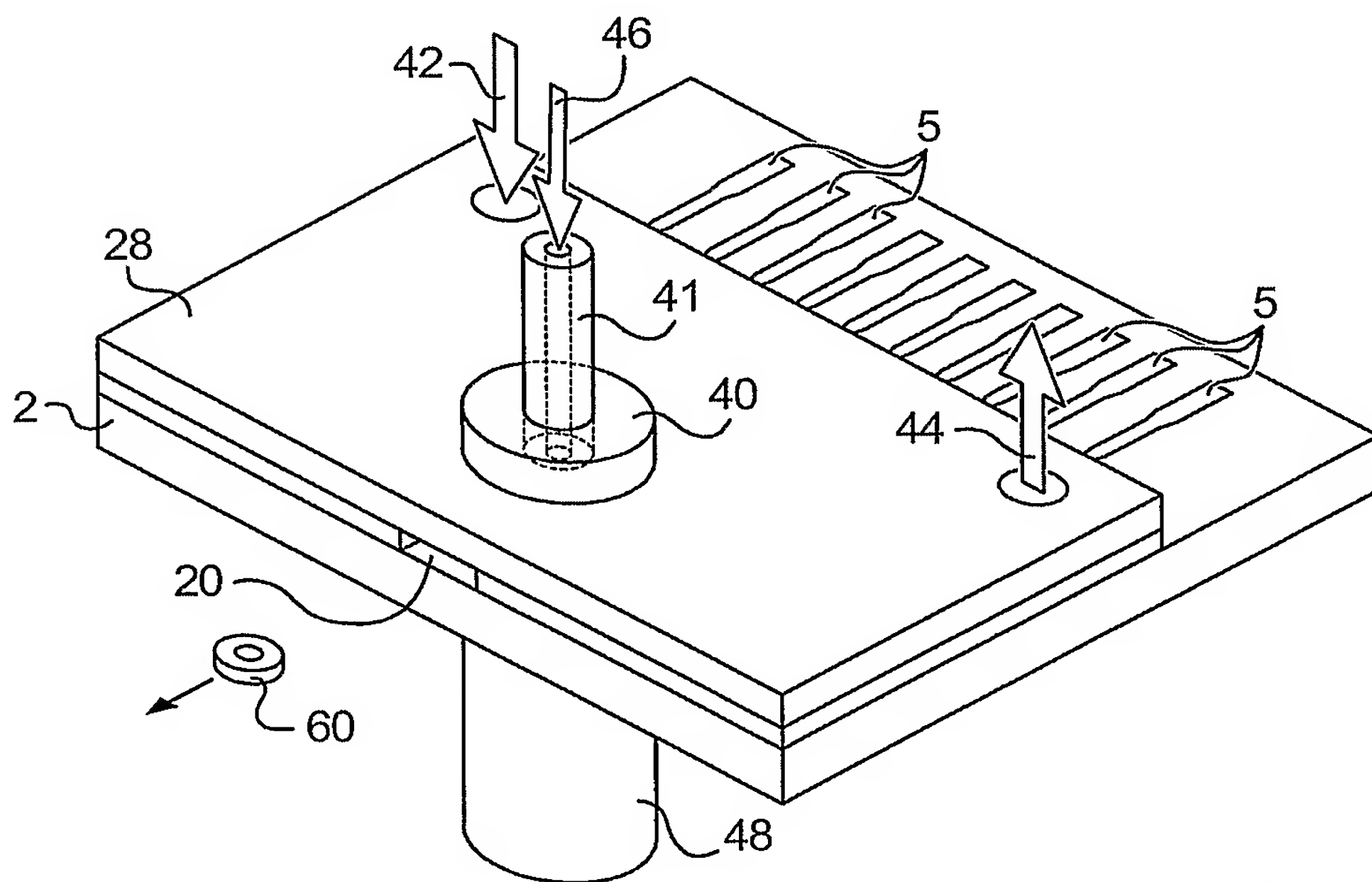


FIG. 3

3/5

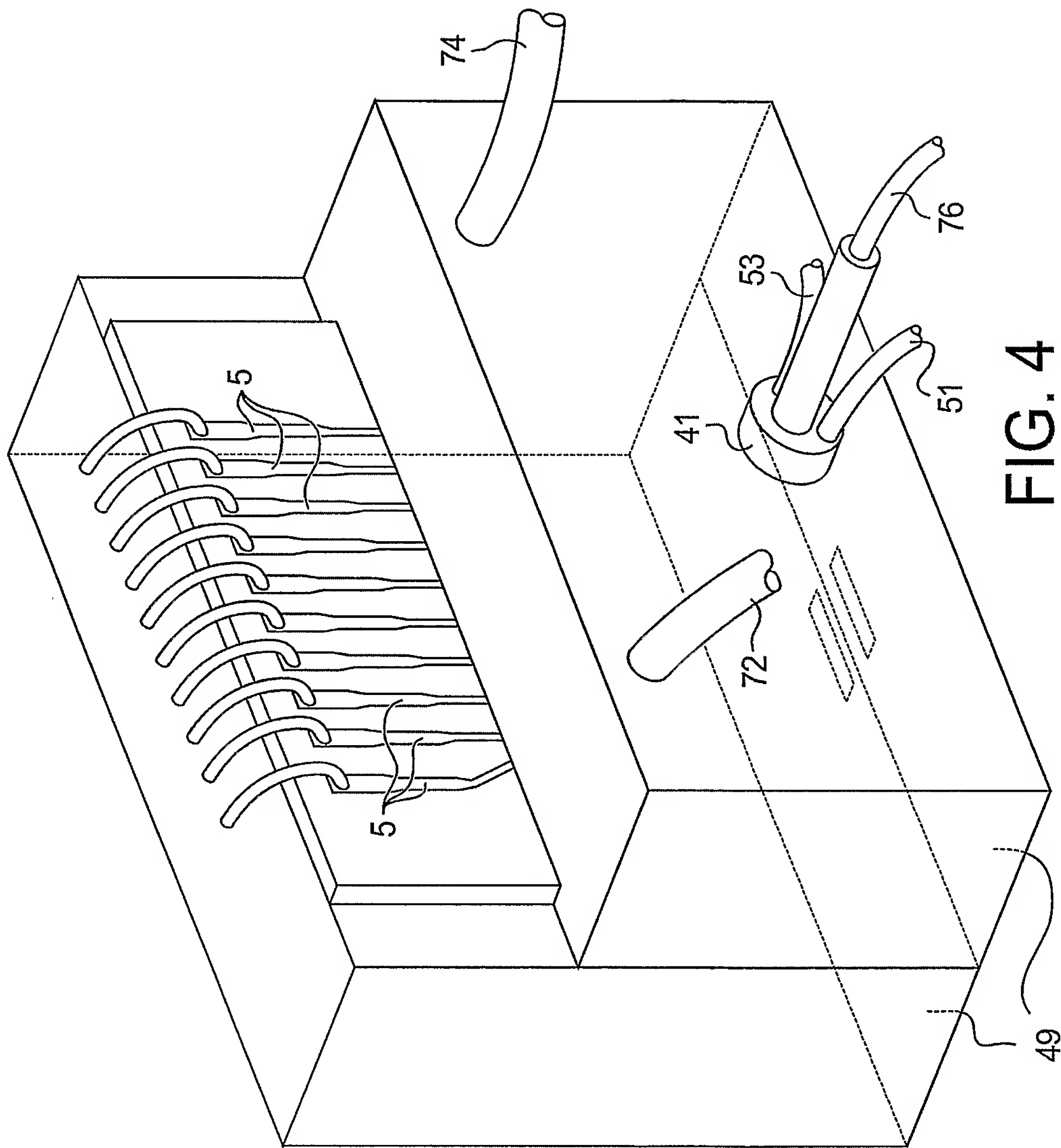


FIG. 4

5/5

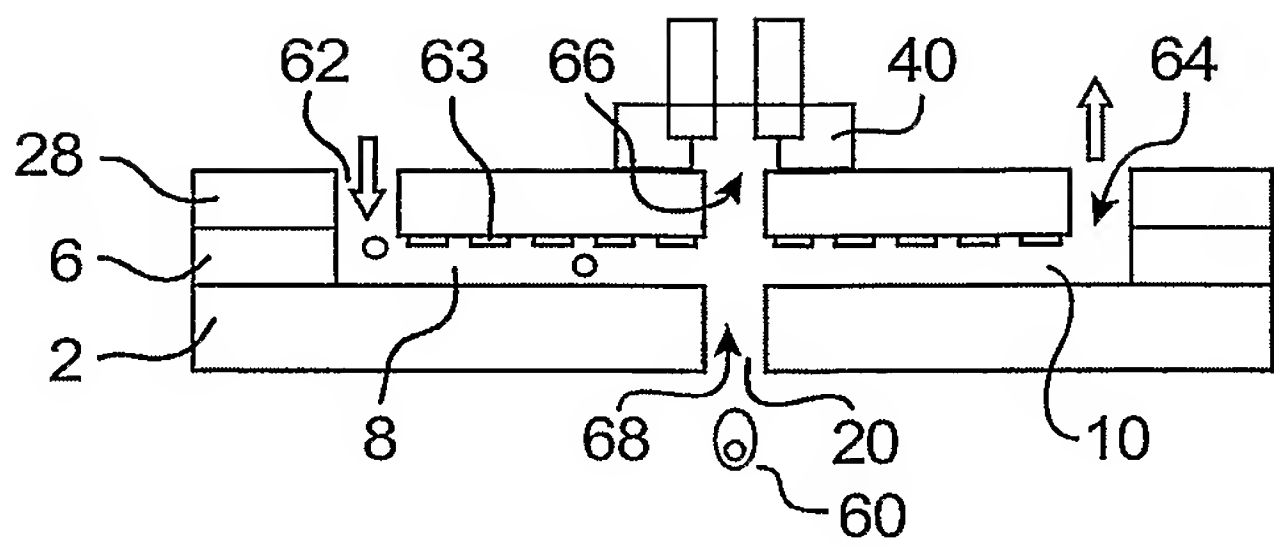


FIG. 6A

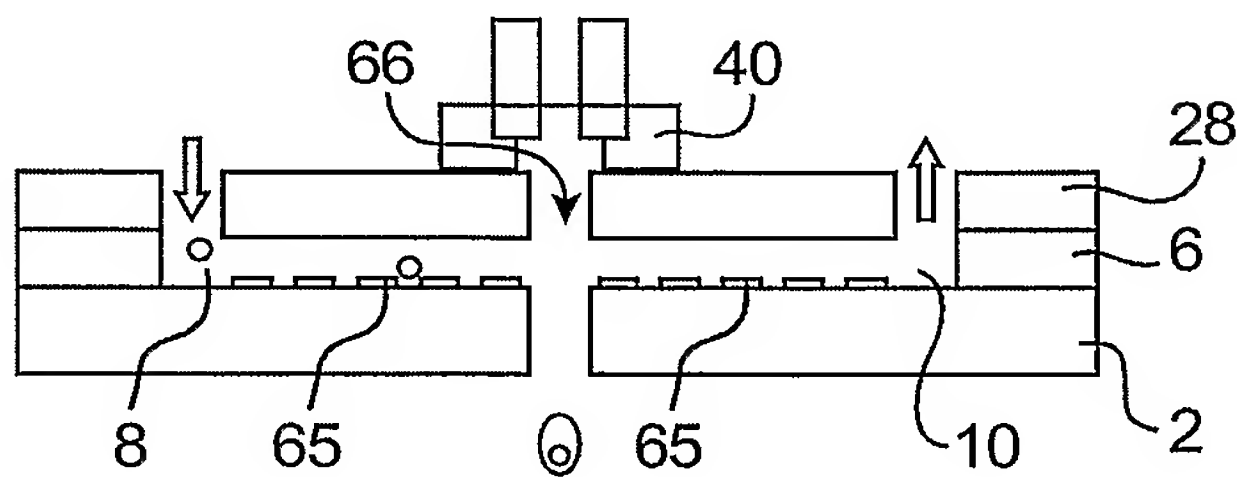


FIG. 6B

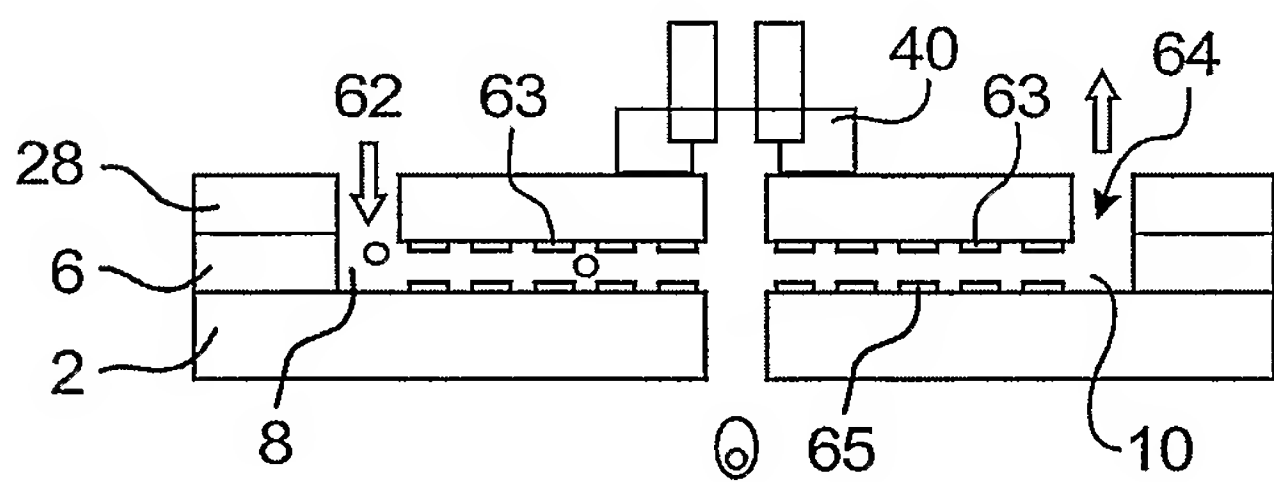


FIG. 6C

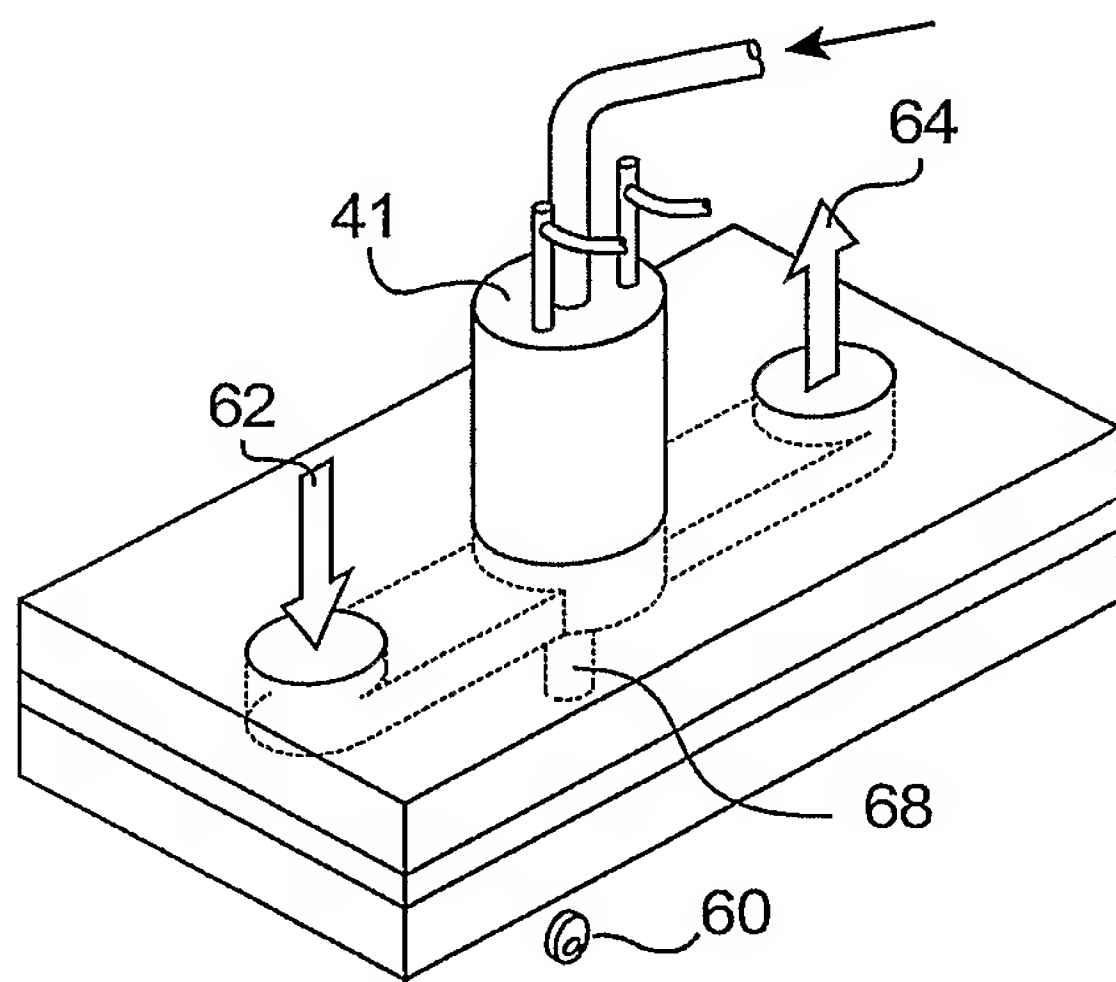


FIG. 6D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/050025

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/02 B01J19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 B01L C12Q B01J A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2003/178310 A1 (GAWAD SHADY ET AL) 25 September 2003 (2003-09-25) cited in the application paragraph '0040! - paragraph '0053! -----	1,28
A	US 2003/108452 A1 (FUHR GUNTER ET AL) 12 June 2003 (2003-06-12) paragraph '0037! - paragraph '0044!; figure 1 -----	1,28
A	US 2002/058332 A1 (QUAKE STEPHEN R ET AL) 16 May 2002 (2002-05-16) paragraph '0012! - paragraph '0021! -----	1,28



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 May 2005

Date of mailing of the international search report

30/05/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tragoustis, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2005/050025

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003178310	A1	25-09-2003	EP 1335198 A1	13-08-2003
			AT 261114 T	15-03-2004
			DE 50200275 D1	08-04-2004
			DK 1335198 T3	12-07-2004
			ES 2217208 T3	01-11-2004
			JP 2003287519 A	10-10-2003
US 2003108452	A1	12-06-2003	DE 10005735 A1	23-08-2001
			AT 279985 T	15-11-2004
			AU 778051 B2	11-11-2004
			AU 3924501 A	20-08-2001
			CA 2401095 A1	16-08-2001
			DE 50104208 D1	25-11-2004
			WO 0158592 A1	16-08-2001
			EP 1253977 A1	06-11-2002
			JP 2003522017 T	22-07-2003
US 2002058332	A1	16-05-2002	AU 9087901 A	26-03-2002
			EP 1334347 A1	13-08-2003
			WO 0223163 A1	21-03-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR2005/050025

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12Q1/02 B01J19/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 B01L C12Q B01J A61L		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 2003/178310 A1 (GAWAD SHADY ET AL) 25 septembre 2003 (2003-09-25) cité dans la demande alinéa '0040! - alinéa '0053! -----	1,28
A	US 2003/108452 A1 (FUHR GUNTER ET AL) 12 juin 2003 (2003-06-12) alinéa '0037! - alinéa '0044!; figure 1 -----	1,28
A	US 2002/058332 A1 (QUAKE STEPHEN R ET AL) 16 mai 2002 (2002-05-16) alinéa '0012! - alinéa '0021! -----	1,28
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div> </div>		
° Catégories spéciales de documents cités:		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">18 mai 2005</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">30/05/2005</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Tragoustis, M</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR2005/050025

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2003178310 A1	25-09-2003	EP 1335198 A1	13-08-2003
		AT 261114 T	15-03-2004
		DE 50200275 D1	08-04-2004
		DK 1335198 T3	12-07-2004
		ES 2217208 T3	01-11-2004
		JP 2003287519 A	10-10-2003
US 2003108452 A1	12-06-2003	DE 10005735 A1	23-08-2001
		AT 279985 T	15-11-2004
		AU 778051 B2	11-11-2004
		AU 3924501 A	20-08-2001
		CA 2401095 A1	16-08-2001
		DE 50104208 D1	25-11-2004
		WO 0158592 A1	16-08-2001
		EP 1253977 A1	06-11-2002
		JP 2003522017 T	22-07-2003
US 2002058332 A1	16-05-2002	AU 9087901 A	26-03-2002
		EP 1334347 A1	13-08-2003
		WO 0223163 A1	21-03-2002